

**Die Wirkung von Kallikrein
auf Ejakulate mit Oligozoospermie
und eingeschränkter Motilität
im Zervixmucus-Penetrationstest**

Axel Größer

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der I. Frauenklinik der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. J. Zander) und
aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische
Biochemie der Universität München, Prof. Dr. H. Fritz.

Die Wirkung von Kallikrein auf Ejakulate mit Oligozoospermie
und eingeschränkter Motilität im Zervixmucus-Penetrationstest

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von



Axel Größer
aus
München

München 1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. H. Fritz
Mitberichterstatter: Professor Dr. J. Zander
Dekan: Professor Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 23. 11. 1976



Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methodik	6
3. Mucusaufbau	13
4. Spermatozoen	19
5. Ergebnisse	21
6. Diskussion	37
7. Zusammenfassung	45
8. Literaturverzeichnis	46
9. Lebenslauf	56

1. EINLEITUNG

Frey, Hartenbach und Schultz (13) waren die ersten, die über einen stimulierenden Effekt von Kallikrein auf die Sexualorgane und Sexualfunktion berichteten. Schon 1953 behandelten sie Patienten, die an ulcus cruris oder am Sudek-Syndrom litten, mehrere Monate lang täglich mit 40 KE i. m.. Einige dieser Patientinnen beobachteten, daß ihre Oligomenorrhoe oder Dysmenorrhoe verschwand und sich eine normale Menstruation einstellte. Andere Patientinnen beobachteten eine Zyklusverkürzung oder eine vermehrte Blutung. Männliche Patienten berichteten über eine gesteigerte Potenz. Im Hinblick auf experimentelle Beobachtungen von Hartenbach (21) an mit Kallikrein behandelten Kaninchen vermuteten die Autoren, daß die oben beschriebenen Effekte durch eine erhöhte Durchblutung der Hypophyse und der Nebennierenrinde hervorgerufen sein könnten.

1962 fanden Jgarashi et al. (23) eine vermehrte Gonadotropinausscheidung im Urin bei Frauen die sich einer ähnlichen Kallikreinbehandlung unterzogen. Jgarashi et al. konnten eine Gonadotropinvermehrung ebenso im Rattenurin und außerdem eine Größenzunahme der Ovarien und des Uterus, bei männlichen Ratten der Samenbläschen, nachweisen. Darüber hinaus beobachteten sie eine Zunahme der Schwanzlänge, des Körpergewichts und eine Gewichtszunahme der Nebennierenrinde und der Schilddrüse. Die Ergebnisse waren statistisch signifikant. Bei den 1964 von Werle et al. (64) durchgeführten Experimenten an Ratten mit Pankreaskallikrein und Kallikrein der Glandula submandibularis konnten die Ergebnisse von Jgarashi zum Teil bestätigt werden, wobei ganz besonders auffällig die Gewichtszunahme der Prostata war. Weitere Ergebnisse führten zu der Vermutung, daß Kininogenasen und ihre Inhibitoren am Biomechanismus der Fortpflanzung beteiligt sind. Schachter et al. (2) fanden 1961 eine hochwirksame Kininogenase in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen von Meer-schweinchen. Dieses Enzym setzt aus Kininogen Bradykinin frei.

Fritz et al. (67, 14) charakterisierten ein trypsinähnliches Enzym aus dem Akrosom der Spermatozoen.

Haendle et al. (18, 19) fanden einen in der Konzentration von den Geschlechtshormonen abhängigen Trypsininhibitor in männlichen Geschlechtsdrüsen, insbesondere im Samenbläschen und im Seminalplasma beim Mann, und einen niedermolekularen Trypsin-Chymotrypsin-inhibitor im Zervixmucus der Frau.

Beobachtungen in jüngerer Zeit von Rixon (47), Rohen (48) und Mandel (29) zeigten, daß Kallikrein das Zellwachstum und die DNA-Synthese stimulieren kann.

Haberland schlug aufgrund der von Rixon, Rohen und Mandel erhaltenen Ergebnisse vor, die Spermatozoenzahl vor und nach der Behandlung mit Kallikrein zu untersuchen.

Schill, Schirren und Hoffmann (56) konnten in jüngster Zeit einen stimulierenden Kallikreineffekt auf die menschliche Spermiogenese bei diagnostizierter Oligozoospermie nachweisen. Dieser Kallikreineffekt zeigte sich insbesondere in einer Zunahme der Spermatozoenzahl und einer prozentualen Vermehrung der normalen Spermatozoenmorphologie sowie in einer Zunahme der Spermatozoenmotilität.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Auswirkung von Kallikrein und anderen Komponenten des Kallikrein-Kininsystems auf die Penetrationsfähigkeit menschlicher Spermatozoen durch ovulatorischen menschlichen Mucus zu untersuchen.

Ulstein (59) hat eine Korrelation zwischen Konzeptionsindex und der Durchdringungsfähigkeit der Spermatozoen durch den Zervixmucus festgestellt. Daher ist die Bestimmung der Fähigkeit der Spermatozoen, durch den ovulatorischen Zervixschleim zu wandern, ein wertvolles klinisches Hilfsmittel, um Informationen über die Befruchtungsfähigkeit des Samens zu erhalten. Für die Klinik ist von Bedeutung, ob die Stimulation der Motilität eingeschränkt motiler Spermatozoen mit Kallikrein zur Verbesserung der Spermatozoenpenetration führt. Mögliche Nebenwirkungen bei der Anwendung von Kallikrein zur künstlichen homologen Insemination sind zu bedenken.

Abzuwägen wären die Risiken für ein Kind einer unter Kallikreinbehandlung zustandegewordenen Konzeption. Bisher sind allerdings keine Nebenwirkungen bei der parenteralen oder oralen Anwendung von Kallikrein (Padutin^R) bekannt geworden (56).

KALLIKREIN-KININ-SYSTEM

Vier Komponenten sind an der Herstellung bzw. Inaktivierung der Kinine beteiligt (s. Abb. 7) :

- a) Das Kininogen ist das spezifische Substrat der Kallikreine.
- b) Kininogenasen, speziell Kallikreine, sind Enzyme, die aus dem Kininogen die Kinine herauspalten. Kallikreine findet man im Blutplasma und außerdem in sekretorischen Drüsen (Pankreas, Glandula submandibularis) sowie in der Niere (10).
Pankreaskallikrein wird unter der Einwirkung von Trypsin aus Präkallikrein freigesetzt (63).
Die Drüsenkallikreine sind durch ihre hohe Spezifität charakterisiert, welche darauf begrenzt ist, aus Kininogen Kinine herzustellen. Andere Kininogenasen mit einer breiten Substratspezifität sind Trypsin, Plasmin und Akrosin.
- c) Die Kinine sind die spezifischen Wirksubstanzen. Sie haben normalerweise nur eine kurze Lebensdauer und werden durch die Kininasen inaktiviert.
- d) Kininasen inaktivieren die Kinine.

Aufgrund früherer Ergebnisse von Schill (49, 50, 51, 52, 53) und denen dieser Arbeit muß man davon ausgehen, daß dem Kallikrein-Kinin-System für das Zustandekommen und den Unterhalt der Spermatozoenmotilität eine wichtige Rolle zukommt.

KALLIKREIN-KININ SYSTEM

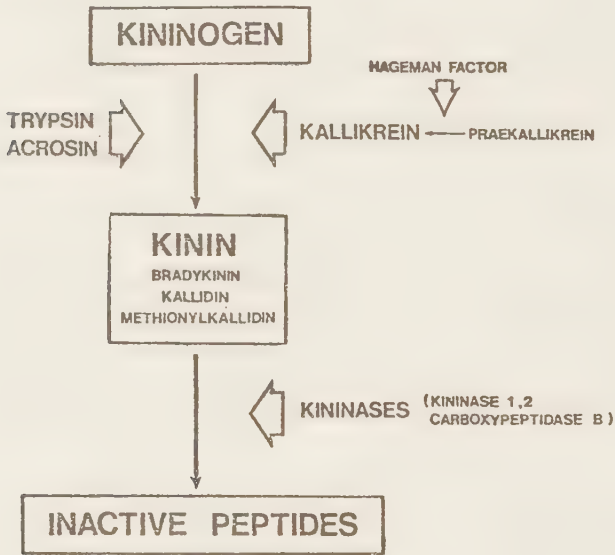


Abb. 7 : Beschreibung des Kallikrein-Kinin Systems
siehe bitte S. 3 .

Definition der Einheiten

1. Eine biologische Kallikrein-Einheit (1 KE) ist diejenige Menge Kallikrein, die bei i.v. Injektion am Carotisdruk eines Hundes dieselbe Senkung auslöst wie 5 ml Harn von gesunden Menschen aus einer Sammelprobe von mindestens 50l, die 24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert worden war (12).

2. Eine Einheit des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors aus Rinderorganen (1 KIE) ist diejenige Menge Inhibitor, die unter Standardbedingungen (15 Minuten Inkubation bei pH 8 und 37°C) 2 KE aus Schweinepankreas zu 50 % hemmt (12). Eine internationale Einheit (1 U) ist die Enzymmenge, welche die Umwandlung von $1\mu\text{Mol}$ Substrat in einer Minute unter Standardbedingungen katalysiert.

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1. Substanzen

Folgende Substanzen wurden den Ejakulaten mit diagnostizierter Oligozoospermie und damit eingeschränkter Spermatozoenmotilität in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt.

Hochgereinigtes Kallikrein aus Schweinepankreas mit einer spezifischen Aktivität von 1180 KE/mg von Bayer AG. Jeweils 1 KE wurde zu 1 ml Ejakulat zugesetzt.

Trasylol, ein Trypsin-Kallikrein Inhibitor aus Organen des Rindes von Bayer AG. Jeweils 5 KIE wurden zu 1ml Ejakulat zugesetzt.

Carboxypeptidase B (No. 2300) von E. Merck Darmstadt. 2 U wurden pro ml Ejakulat zugesetzt.

0,05 ml physiologische Kochsalzlösung, die 0,2 KE enthielt, wurde zu den 0,2 ml Portionen derselben Ejakulatproben gegeben.

Zu den 0,2 ml desselben Ejakulats des Kontrollsystems wurden nur 0,05 ml physiologische Kochsalzlösung ohne Zusatzsubstanzen gegeben.

Entsprechend gingen wir bei den Versuchen mit Carboxypeptidase B und Trasylol vor. 0,4 U Carboxypeptidase B in 0,05 ml physiologischer Kochsalzlösung, bzw. 1 KIE Trasylol in 0,05 ml physiologischer Kochsalzlösung die 0,2 KE enthielt, wurden zu einer 0,2 ml Portion derselben Ejakulatprobe gegeben.

2.2. Ejakulat

Es wurden Ejakulate ausgewählt, die die Kriterien der Oligozoospermie mit einer Spermatozoenzahl unter 40 Millionen/ml und einer auf 20-40% verminderten Spermatozoenmotilität aufwiesen. Für die Ejakulatanalyse wurden folgende Parameter bestimmt: Volumen, Viskosität, Farbe, Geruch, pH-Wert, die quantitative und qualitative Motilität (d.h. der Prozentsatz der beweglichen Spermatozoen und der Prozentsatz der Spermatozoen mit sehr guter Vorwärtsbewegung), Spermatozoen-

zahl, Spermatozoenmorphologie und Fruktosegehalt (57). Die Qualität des Ejakulats wurde nach den Empfehlungen des Europäischen Andrologieclubs bestimmt (68). Die Tests wurden innerhalb von 2 Stunden nach der Ejakulation durchgeführt.

2.3. Zervixmucus

Wir verwendeten den Zervixmucus von ovulierenden Frauen mit erwiesener Fruchtbarkeit. Vor der Mucusementnahme wurde mit einem Tupfer die äußere Öffnung des Zervixkanals gereinigt. Zur Mucusgewinnung verwendeten wir ähnlich wie Cohen (6) eine Spritze mit einer etwa 12 cm langen, abgestumpften Edelstahlkanüle, deren Innendurchmesser 2 mm betrug. In einigen Fällen war es uns möglich den Zervixmucus direkt in die ca. 50 cm langen Glaskapillaren zu aspirieren. Dabei wurden jeweils von den beiden Enden der 50 cm langen Kapillarröhrchen 5 cm verworfen, weil sich herausstellte, daß diese Stücke nicht verwertbar waren. Es wurde außerdem streng darauf geachtet das Auftreten von Luftblasen im Mucus zu vermeiden. Kapillaren mit Luftblasen wurden für die Tests nicht verwendet. Der Mucus wurde sorgfältig vorgetestet in Hinblick auf Penetrationsfähigkeit. Er mußte die folgenden Kriterien erfüllen: Sauberkeit (d.h. geringe Epithel- und Leukozytenzellzahl), Farnkrautphänomen +++, Spinnbarkeit über 8 cm, pH-Wert zwischen 7 und 8,5 sofort nach Mucusementnahme gemessen. Falls die Kapillarröhrchen nicht sofort verwendet wurden, verschlossen wir sie mit Flastilin und verwahrten sie im Kühlschrank bei 4° C auf. Die Aufbewahrungszeit überstieg nie 2 Wochen (61).

2.4. Zervixmucus-Spermatozoenpenetrationstest

Die Penetrationsfähigkeit der Spermatozoen kann man mit Hilfe mehrerer in vitro Methoden beobachten (26, 3, 46, 4).

Wir verwendeten für unsere Experimente den leicht modifizierten in vitro Kapillarröhrchentest nach Kremer (25). Die von den Spermatozoen zurückgelegte Wegstrecke wurde mit einem Phasenkontrastmikroskop nach 1 und 2 Stunden bestimmt. Die Inkubationstemperatur betrug 37° C. Die Anzahl der Spermatozoen wurde bei 100-facher Vergrößerung im mikroskopischen Gesichtsfeld in einer Entfernung von 2 und 4 bzw. 5 cm , gerechnet von der Kontaktstelle zwischen Mucus und Ejakulat, gemessen. Dieses Vorgehen erlaubte uns sowohl eine zeitabhängige Schätzung der am weitesten in den Mucus vorgedrungenen Spermatozoen als auch die Bestimmung der Spermatozoenzahl bei unterschiedlichen Penetrationsabständen. Um eine Vergleichsmöglichkeit zwischen Kontroll- und Testsystem zu erhalten, wurde in jedem System die entsprechende Wanderungstrecke bei 2, 4 bzw. 5 cm mit der Anzahl der dort befindlichen Spermatozoen multipliziert, sodaß wir zu dem definierten Beobachtungszeitraum die zurückgelegte Gesamtpenetrationstrecke der Spermatozoen in cm erhalten haben.

2.5. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Jedes Experiment wurde 4-fach durchgeführt; der Mittelwert und die Standardabweichung vom Mittelwert wurden daraus bestimmt. Bei 14 Versuchen wurde der Korrelationskoeffizient zwischen der Gesamtpenetrationsstrecke und der quantitativen Spermienmotilität errechnet.

Der Unterschied der von den Spermien zurückgelegten Gesamtwegstrecke wurde für jeden einzelnen Test bestimmt und in Prozent ausgedrückt.

Die Gesamtzahl der Spermien aller 46 Tests wurde bei 2 cm Wanderstrecke untereinander, bei den mit und ohne Kallikrein behandelten Spermien, verglichen.

Wir wendeten bei der Auswertung außerdem den Student-t-Test (22, 66) an, wobei wir einen Vergleich von Erwartungswerten bei verbundenen Stichproben anstellten. Es gilt:

Gegeben seien die Werte $(x_i; y_i)$ ($i=1, \dots, n$) zweier Meßreihen aus Messungen, die paarweise unter gleichen Bedingungen gemacht wurden, während die Bedingungen von Wertpaar zu Wertpaar verschieden sind.

x_i bezeichne dabei den Stichprobenwert bei einer bestimmten Testsubstanz, y_i bezeichne den zugehörigen Wert der Kontrollsubstanz.

Es kann angenommen werden, daß jedes x_i ein Stichprobenwert aus einer (μ_i, σ_x) -normalverteilten Grundgesamtheit und jedes y_i ein Stichprobenwert aus einer (η_i, σ_y) -normalverteilten Grundgesamtheit ist.

Es liegen also $2n$ Stichproben jeweils vom Umfang 1 vor.

Sie sind alle unabhängig.

Alle Erwartungswerte μ_i, σ_x ($i=1, \dots, n$) sind unbekannt, sowie die Standardabweichungen σ_x und σ_y .

Ziel der Untersuchung ist, einen signifikanten Unterschied im Verhalten der Testsubstanz (Erwartungswert μ der gesamten Penetrationsstrecke im Testmaterial) gegenüber dem Verhalten der Kontrollsubstanz (Erwartungswert η) festzustellen.

Das Problem reduziert sich damit auf die Aufgabe,

aus den $2n$ Stichprobenwerten unter Umgehung der $2n$ unbekannten Erwartungswerte ξ_i und η_i auf eine gemeinsame Aussage über den Unterschied zwischen den Erwartungswerten ξ und η zu kommen.

Der erste Schritt zu einer Lösung ist, zu prüfen, ob überhaupt signifikante Qualitätsunterschiede zwischen Test- und Kontrollsubstanz vorhanden sind. In einem zweiten Schritt können dann, falls dies bejaht wird, die Unterschiede zwischen ξ und η untersucht werden.

Generell ist zu sagen, daß die Differenzen der Versuchsergebnisse $d_i = x_i - y_i$ ($i = 1, \dots, n$), abgesehen von zufälligen Schwankungen, auf die Unterschiede der Qualitäten von Test- und Kontrollsubstanz zurückzuführen sind.

Nach den Additionstheorien der Normalverteilung sind also die Differenzen d_i Werte einer Stichprobe vom Umfang n aus einer $(\xi - \eta; \sigma^2)$ -normalverteilten Grundgesamtheit. Dabei ist $\sigma^2 = \sigma_x^2 + \sigma_y^2$.

Wir haben damit das Problem zweier Stichproben x und y auf das Problem einer Stichprobe d zurückgeführt.

Schritt I:

Wir stellen die Hypothese auf, daß der Erwartungswert ξ der Testsubstanz höchstens gleich dem Erwartungswert η der Kontrollsubstanz ist:

$$H: \xi \leq \eta$$

Dagegen setzen wir die Alternative:

$$K: \xi > \eta$$

Wenn die Hypothese H zu verneinen ist, dann trifft die Alternative K zu.

Nun ist jedoch nicht mit absoluter Sicherheit entscheidbar, ob die Alternative K zutrifft. Es könnte auch der Fall eintreten, daß man sich irrtümlich für K entscheidet, obwohl in Wirklichkeit H zutrifft. Dieser Irrtum darf höch-

stens mit der Wahrscheinlichkeit α eintreten (Irrtumswahrscheinlichkeit). Damit können wir die Hypothese H mit einer Sicherheitswahrscheinlichkeit $1 - \alpha$ ablehnen.

Als mindeste Sicherheitswahrscheinlichkeit wird für medizinische Tests dieser Art $1 - \alpha = 95\%$ verlangt.

Wir testen daher die Hypothese H , um festzustellen, mit welcher Sicherheit wir die Annahme $\xi \leq \eta$ verneinen können. Dafür eignet sich der Student-t-Test für verbundene Stichproben zur Prüfung der Hypothese $\xi - \eta = 0$ gegen die Alternative $\xi - \eta > 0$ bei unbekannter Varianz (einseitiger Test). Bei einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von $1 - \alpha = p\%$ ist die Hypothese H abzulehnen, falls

$$(1) \quad \frac{\bar{d}}{s} \cdot \sqrt{n} > t_{p\%}^{(n-1)} \quad \text{ist.}$$

Dabei ist

$$\bar{d} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n d_i \quad \text{und} \quad s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})^2}.$$

$t_{p\%}^{(n-1)}$ ist die $p\%$ -Fraktile der Student-Verteilung zum Freiheitsgrad $n-1$, d. h. der Wert, bei dem nach Wahrscheinlichkeit p aller Versuche einen Wert kleiner als $t_{p\%}^{(n-1)}$ ergeben.

Falls die Ungleichung (1) zutrifft, dann trifft bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = (100 - p) \%$ die Alternative K zu.

Schritt II :

Wenn k zutrifft, dann kann der Qualitätsunterschied zwischen Test- und Kontrollsubstanz untersucht werden. Dazu kann eine Schätzfunktion f für die Differenz $\xi - \eta$ angegeben werden. f ist sogenannte Punktschätzung für den Parameter $\xi - \eta$ der oben erwähnten $(\xi - \eta; \sigma)$ -Verteilung.

Für f gilt:

$$f = \bar{x} - \bar{y} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i - \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n y_i = \frac{1}{n} \left(\sum_{i=1}^n x_i - \sum_{i=1}^n y_i \right) =$$

$$= \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - y_i) = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n d_i = \bar{d} ;$$

$\bar{d}$ ist also beste Schätzung für die Differenz $\xi - \eta$.

Schritt III :

Der Student-t-Test erlaubt auch eine quantitative Aussage über den Erwartungswert d der Differenz $d = \xi - \eta$

Es ist nämlich

$$d \gg \bar{d} - t_{p\%} (n-1) \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{mit einer}$$

p -prozentigen Wahrscheinlichkeit.

Es ist nicht zulässig, bei einer geforderten Sicherheitswahrscheinlichkeit von $95\% = 1 - \alpha$ die Fraktile $t_{p\%}$ für p -Werte größer als 95% zu wählen, wie es oft fälschlicherweise gemacht wird. Diese Forderung gilt auch für den Signifikanztest (Schritt I). Für $p > 1 - \alpha$ nimmt nämlich die Schärfe des t-Test (d.h. die Wahrscheinlichkeit, sich für die Alternative K zu entscheiden, wenn K tatsächlich zutrifft) stark ab. Damit würde man die Hypothese H zu stark betonen und man würde, über mehrere Versuchsreihen hinweg, einen großen Fehler in Kauf nehmen, K irrtümlich abzulehnen.

3. MUCUSAUFBAU.

3.1. Histologie der Zervix uteri

Der Zervikalkanal ist mit einem Epithelmantel von schleimbildenden Zylinderzellen ausgekleidet. Dieser Epithelmantel ist stark gefaltet und in die Tiefe verzweigt, so daß man von einem komplizierten System von Krypten spricht. Das Zervixepithel umfaßt verschiedene Typen von sekretorischen Zellen, die mit Flimmerepithel ausgestattet sein können. Das Vorkommen dieser Zellen, ihre zytologischen und histologischen Eigenschaften sowie die Natur und Masse von Sekretgranula variiert in den verschiedenen Teilen der Zervix. Die Zellen ohne Flimmerhärchen, die aber mit Mikrovilli bedeckt sind, sondern wahrscheinlich das Sekret ab, denn sie enthalten eine große Menge zytoplasmatischer Granula (69). Die mit Kinozilien ausgestatteten Zellen enthalten wenig Sekretgranula. Die Kinozilien schlagen in Richtung Vagina und scheinen für den Spermientransport keine Bedeutung zu haben (69). Die tägliche Produktion an Mucus beträgt ca. 60 mg in der präovulatorischen Zyklusphase und 20-60 mg während anderer Zyklusphasen.

Nach neueren Untersuchungen (42) muß man annehmen, daß eine einzelne Krypte einen gemischten Mucus produzieren kann und nicht nur einen Mucus vom Typ G oder vom Typ E (s.u.). Von Gebel wurde sogar berichtet (43), daß das Sekret einer individuellen Zelle der Zervixkrypten eine heterogene Zusammensetzung hat.

3.2. Biochemie des Mucus

Der Zervixmucus besteht aus zwei Phasen:

Einer hochviskösen Komponente, der Gelphase, und einer niederviskösen Komponente, dem Zervixplasma.

Gel-Phase: Hauptbestandteildes Zervixmucus ist das Muzin, das (16) aus einem polydispersen System von Glykoproteinmolekülen mit starker Verzweigungstendenz besteht. Diese Glykoproteine sind aus 75-80% Kohlenhydratanteil und 20-25% Aminosäurebausteinen zusammengesetzt (16).
Genauer bestehen die Glykoproteine wahrscheinlich aus einem Polypeptidgerüst, das zahlreiche verzweigte Heterosaccharidketten aufweist und als Hauptkomponenten Galaktose, N-Acetylglukosamin und N-Acetylgalaktosamin enthält. Man diskutiert neuerdings auch ein reichliches Vorkommen von Glukose ('65).

Das Muzin ist ein fibrillär angeordnetes System von Glykoproteinen. Für die Verbindungen zwischen den Muzinmolekülen spielen Disulfidbrücken (Cystein) und möglicherweise ein sogenanntes " cross-linking agent " eine entscheidende Rolle (31).

Plasma-Phase: Sie besteht aus 0,7% NaCl, Spuren von K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , Cu^{++} , Phosphat, Sulfat, Bicarbonat sowie Glukose, Glykogen, Maltose, Mannose, Aminosäuren, Proteinen, Peptiden und Lipiden (69).

Der Mucus enthält keine Hyaluronidase, wie früher angenommen wurde (41).

Ein wichtiger Befund ist, daß die Immunglobuline und die Proteinaseinhibitoren, wobei letztere die Fähigkeit zur Interaktion mit akrosomaler Proteinase der Spermier und der Seminalplasma proteinase haben, ihre niedrigste Konzentration während der Befruchtungsperiode des Zyklus zeigen, also zu dem Zeitpunkt, wo der Zervixmucus seine größte Empfänglichkeit für die Spermienpenetration aufweist (69).

Die An- oder Abwesenheit von Inhibitoren für die im Seminalplasma befindlichen Proteinasen könnte ein kritischer Faktor für den enzymatischen Prozeß, der sich bei der Empfängnis abspielt, sein (69).

Von einigen Spurenelementen (Zn, Mg, Cu) weiß man, daß sie die Enzymsysteme im Mucus und in den Spermatozoen beeinflussen. Die Konzentrationen dieser Spurenelemente sind um den Ovulationstermin jedoch am geringsten (69).

3.3. Physiologie des Zervixmucus

Während des Zyklus ändert der Mucus seinen Zustand unter dem Einfluß der Hormone, der Östrogene und Gestagene. Der östrogene Mucus vom Typ E ist optimal zum Zeitpunkt der Ovulation vorhanden. Nach Odeblad (41) enthält der Mucus vom Typ E 95-98,5% Wasser, bis 1% Proteine, 0,8% NaCl, 0,5-1,5% Muzin und sehr wenige Zellen (Leukozyten, exfoliierte Zellen, Zelldetritus, Erythrozyten, Bakterien und Spermatozoen).

Das Muzin, das hauptsächlich die Fließeigenschaften des Mucus bestimmt, ist in Mizellen angeordnet mit einem Abstand von 0,5-5 μ und einem Querdurchmesser von 0,5 μ der Mizellen, zwischen denen relativ wenige Querverbindungen bestehen (s. Abb. 8). Nach Kellermann und Weld (24) ist der Glukosegehalt beim normalen Mucus vom Typ E angestiegen, während bei infertilen Patienten häufig ein Glukoseabfall gefunden wurde.

Der Mucus vom Typ E zeigt ein stark positives Farnkrautphänomen, große Spinnbarkeit und Spermatozoenempfänglichkeit. Der optimale pH-Wert für die Spermatozoenmigration und das Überleben der Spermatozoen im Mucus liegt zwischen 7 und 8,5 (33, 34). Diesen pH-Wert zeigt der normale präovulatorische Zervixmucus.

Der gestagene Mucus vom Typ G zeigt dagegen einen geringeren Wassergehalt von 85-92%, 2-4% Proteine, 0,8% NaCl, 2-10% Muzin und reichlich Zellen. Das Muzin ist in einem dichten Netzwerk mit einer Maschengröße von nur 0,1-0,5 μ und Makromolekularfäden mit einem Querdurchmesser von 0,2 μ angeordnet. Eine Mizellenanordnung ist selten, dagegen sehen wir massenhaft Querverbindungen zwischen den Makromolekülen (42) (s. Abb. 9). Beim Typ G ist die Spermatozoenpenetration praktisch unmöglich, da die Spermatozoenkopfbreite 2,5 μ und die Spermatozoenkopftiefe 1,5 μ beträgt (42). Das Farnkrautphänomen fehlt, die Spinnbarkeit ist nur gering.

Während des gesamten Zyklus sind beide Mucustypen vorhanden, nur variiert ihr Verhältnis:

Zum Zeitpunkt der Ovulation finden wir 95% vom Typ E und nach der Ovulation bis 90% vom Typ G (42).

Aufgrund der Muzinanordnung des Mucustyps E schwimmen die Spermien in den Kanälen mit sehr geringer Viskosität, um so wenig wie möglich an Energie zu verbrauchen (42). Es gibt experimentelle Daten, die die Vermutung zulassen, daß Energie vom Muzinnetzwerk auf die schwimmenden Spermien übertragen wird (42, 40).

Kellermann und Weld (24) fanden außerdem, daß die Überlebenszeit der Spermien in vitro in direkter Beziehung zum Glukosegehalt des Zervixmukus steht.

Der wichtigste Bestandteil des Mucus, das Muzin, ist verantwortlich für seine verschiedenen physikalischen Eigenschaften. Die Funktion des Mucus besteht nach Meinung maßgeblicher Wissenschaftler in (69):

1. Begünstigung der Spermienpenetration zum Zeitpunkt der Ovulation und Verhinderung des Spermieintritts während anderer Zeitpunkte der Zyklusphase.
2. Schutz der Spermien vor dem vaginalen Milieu (sauer!) und vor der Phagozytose durch Leukozyten.
3. Filtereffekt (pathologische Spermienformen und gering bewegliche Spermien; Barriere für Mikroorganismen und unerwünschtes Fremdmaterial).
4. Spermienreservoir
5. Möglicher Ort für die Kapazitation der Spermien.

Nach Odeblad (42) gibt es einige grundsätzliche Faktoren die für die Spermienmotilität im Mucus von Bedeutung sind:

1. Jedes einzelne Spermium hat seinen individuellen Bewegungsablauf, d.h. eine Zelle kann an einer bestimmten Stelle verharren um dann plötzlich sich für eine kürzere oder längere Zeit zu bewegen zu beginnen, bevor sie erneut eine veränderliche Zeitspanne an einer Stelle bleibt und der Vorgang wieder von neuem beginnt, oder das Spermium endgültig an dem Ort bleibt.

2. Die Spermien, die überall im homogenen Mucus vorhanden sind, zeigen große Unterschiede in der Schlagfrequenz, der Schlagamplitude und der Schwimgeschwindigkeit.
3. Man findet häufig verschiedene Mucustypen im gleichen Mikroskontfeld mit veränderten Schwimmbedingungen für die Spermien.

Es soll schon hier vorweggenommen werden, daß die relativ starke Streuung der Spermienzahl an einer bestimmten Ablesemarke beim Migrationstest bei 4 Versuchen mit gleichem Mucus und gleichem Ejakulat somit verständlich wird.

Für die Spermienmigration durch den Zervixmucus ist von Bedeutung:

1. Die aktive Bewegungsfähigkeit des Spermiums.
2. Das fibrilläre Netz des Muzins mit seinen Maschen und somit der Einfluß der Hormone (Östrogene, Gestagene).
3. Die Unterstützung der energetischen Bedürfnisse der Spermien.

Bis vor wenigen Jahren nahm man an, daß die Spermienmotilität und die Empfänglichkeit des Zervixmucus für die Spermienmigration durch den Zervixkanal die bedeutensten Faktoren seien. Heute wissen wir, daß es weitere offenbar sehr wichtige Faktoren, nämlich die proteolytischen Aktivitäten des Seminalplasmas und der Spermien, gibt.

Von größter Bedeutung für die Spermienmigration ist sicherlich die Viskosität des Mucus. Dabei gilt allgemein für die Spermien, daß der am wenigsten visköse Mucus der zu bevorzugende ist (35). Besonders interessant in diesem Zusammenhang sind in vitro Untersuchungen von Moghissi , bei denen die Zugabe von gewöhnlichem Pankreastrepsin oder Chymotrypsin zu menschlichem Ejakulat oder menschlichem Zervixmucus die Spermienmigration erleichterte (35, 36, 37).

" Die Inkubation von Zervixmucus mit isolierter und gereinigter Seminalprotease bedingt eine Hydrolyse des Mucus, der eine Zunahme der Spermienmigration folgt. Die Zugabe von Seminalprotease zu frischem Ejakulat erhöht ebenfalls die Spermienmigration " (38 zit.)

Entsprechende Versuche haben auch wir mit Kallikreinzusatz zum Mucus bzw. zum Ejakulat gemacht, wobei nur bei Zugabe zum Ejakulat eine signifikante Zunahme der Spermienmigration beobachtet werden konnte.

4. SPERMATOCYTES

Ein fertiges Spermatozoon besteht histologisch aus (28) :

1) Einem Kopf mit dem haploiden Zellkern.

Der Kopf ist $3-5\mu$ lang, $2,5\mu$ breit und $1,5\mu$ tief.

Der zugespitzte Teil des Kopfes trägt kappenartig das Akrosom.

2) Einem Hals, der der Beweglichkeit des Kopfes dient.

Er enthält das Zentriol.

3) Einem Mittelstück, das vom Achsenfaden durchzogen wird, welchen die Mitochondrien umgeben. Die Achse des Mittelstückes bildet eine "9+2" Struktur. Diesen Fäden lagern sich außen neun weitere, wesentlich dickere homogene Fibrillen an, die bis an den Anfang des Schwanzes reichen. Am distalen Schwanzende fehlt die "9+2" Struktur.

4) Einem Schwanz.

Das gesamte Spermatozoon wird von einem Plasmalemm überzogen.

Die Spermatozoengesamtlänge beträgt ca. 50μ .

Biochemie:

Das Akrosom enthält die Hyaluronidase, das Akrosin und andere Enzyme (38) zur Perforation der Füllhüllen.

Die Spermatozoen enthalten weiter die Enzyme für Glykolyse, Citratzyklus, Fettsäureoxydation, Atmungskette, und wahrscheinlich für den Pentosephosphatzyklus (38).

Diese Enzyme befinden sich in den Mitochondrien und im Schwanz.

Die Spermatozoen besitzen die Fähigkeit exogene und endogene Substrate zu metabolisieren (38).

Im menschlichen Samen sind u.a. folgende Komponenten enthalten:

Fruktose, Phosphorylcholin, Ergothionin, Ascorbinsäure, Spermin, Citronensäure, Cholesterin, Phospholipide, Fibrinogenase, Phosphat, Bicarbonat, Prostaglandine und Hyaluronidase.

Besitzen die Spermatozoen nur geringe endogene Glykogenvorräte, so werden sie während der Passage durch den Zervixmucus von den extrazellulären Kohlenhydraten abhängig.

Im Ejakulat bezieht ein Spermatozoon seine Energie von der Fruktose durch anaerobe Fruktolyse (38).

Im Zervixmucus in vivo laufen die Spermatozoen hauptsächlich der Peripherie entlang und innerhalb der Krypten, weil sich dort sehr wahrscheinlich Sauerstoff befindet und die aerobe Metabolisierung effizienter als die anaerobe ist (38).

In Abwesenheit von verwertbarem Zucker wird die Spermatozoenmotilität stark gehemmt, kehrt jedoch bei Zugabe entsprechender Zucker wieder zurück (38).

Nach Mann (30) hängt die Gesamtmenge der erforderlichen Energie eines Spermatozoon von mindestens 3 Faktoren ab:

1. Das Spermatozoon muß die Trägheit des Schwanzes überwinden, um eine gute Vorwärtsbewegung zu erreichen.
2. Das Spermatozoon muß den Widerstand seiner Umgebung überwinden.
3. Die Spermatozoen müssen den Widerstand, der durch die Nähe anderer Spermatozoen bedingt ist, überwinden.

5. ERGEBNISSE

5.1. Für die Beurteilung " positiver, kein oder negativer Effekt " wählten wir folgendes Kriterium:

Die Gesamtpenetrationsstrecke mußte sich um mindestens 33% zwischen dem Kontrollansatz und dem Testansatz (mit Kallikrein) unterscheiden. Für die Versuche mit Carboxypeptidase B und Trasylol galt dasselbe.

Bezüglich der Gesamtpenetrationsstrecke zeigten die kallikrein-stimulierten Spermien gegenüber den Kontrollspermien nach der 1. Stunde eine Zunahme um 54,8%, nach der 2. Stunde um 42,9%. Addiert man die 1 und 2 Stundenwerte, so ergibt sich eine Zunahme von durchschnittlich 48,8%. Als Mittelwert ergibt sich für die Kontrollspermien nach der 1. Stunde eine Strecke von 352,1 cm (Standardabweichung vom Mittelwert ± 56 cm), nach der 2. Stunde von 502 cm (Standardabweichung vom Mittelwert ± 81 cm). Bezugsreferenz waren die Mittelwerte der kallikrein-stimulierten Spermien nach der 1. Stunde bereits 513,2 cm (Standardabweichung vom Mittelwert ± 87 cm), nach der 2. Stunde 719,4 cm (Standardabweichung vom Mittelwert ± 115 cm) (s. Abb. 1). Einen typischen Einzelversuch zeigt die Abb. 5.

5.2. Betrachtet man die absolute Anzahl der Spermien bei 7 cm, so fanden wir nach der 1. Stunde 874 Spermien bei der Kontrolle und 1138 Spermien bei den kallikreinstimulierten Spermien d.h. 40,3% mehr Spermien und nach der 2. Stunde 11545 gegenüber 15820 bei den kallikreinstimulierten Spermien, d.h. 37% mehr Spermien (s. Abb. 2).

5.3. Die Zunahme der Penetrationsfähigkeit von kallikrein-stimulierten Spermatozoen ist noch signifikanter, wenn wir die individuelle Motilitätssteigerung betrachten (s. Tab. 1). Berücksichtigten wir nur die Tests, die nach der ersten und zweiten Stunde eine Stimulation der Spermienpenetration zeigten, so fanden wir bei 60,9% einen Anstieg von durchschnittlich 108,8% in der Gesamtpenetrationsstrecke. Im Gegensatz dazu

zeigten 5,4% der Tests eine Abnahme der gesamten Penetrationsstrecke, während bei 33,7% kein Stimulationseffekt nachzuweisen war.

5.4. Ergebnisse des Student-t-Tests von 46 Versuchen mit Kallikrein als Testsubstanz.

Mit dem I. Schritt läßt sich für den 1 und 2 Stundenwert die Hypothese H_0 verwerfen und damit tritt die Alternative H_1 ein. Für die Schätzfunktion (II. Schritt) erhalten wir nach der 1. Stunde eine Differenz der Penetrationsstrecken im Mittel von 181,1 cm, nach der 2. Stunde von 215,4 cm.

Mit den Testschritten I und II können wir nun die Aussage machen, daß ein signifikanter Unterschied in der Qualität zwischen Test- und Kontrollsubstanz besteht mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

Der III. Schritt ergibt nach der 1. Stunde daß $\bar{d}$ mit einer 95%-igen Wahrscheinlichkeit größer als 91,3 cm ist und nach der 2. Stunde daß $\bar{d}$ größer als 112,5 cm ist.

Mit dem III. Schritt können wir zeigen, daß auch eine Aussage in quantitativer Hinsicht möglich ist.

5.5. Auswertung nach dem Student-t-Test von 46 Versuchen mit Kallikrein als Testsubstanz.

I. Schritt: Für die Größen $\bar{d}$ und s haben sich bei 46 Versuchen nach 1 Stunde die Werte

$$\bar{d} = \underline{181,1}$$

$$s = \underline{363,2}$$

ergehen.

Bei der Sicherheitswahrscheinlichkeit $1-\alpha = 95\%$ ist

$$t^{(45)}_{95\%} = 1,679$$

$$\text{Damit ist } \frac{\bar{d}}{s} \cdot \sqrt{n} = 3,38 > 1,679 = t^{(45)}_{95\%} \quad \text{und die Hypothese } H_0$$

ist zugunsten von K abzulehnen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

II. Schritt: Für die Schätzfunktion f ergibt sich nach der

1. Stunde: $f = \bar{x} - \bar{y} = 513,2 - 332,1 = \underline{181,1}$

III. Schritt: Zur quantitativen Aussage nach der 1. Stunde

ergibt sich: $\bar{d} - t_{95\%}^{(45)} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} = \underline{91,3}$

I. Schritt: Für die Größen $\bar{d}$ und s haben sich bei 46 Versuchen nach 2 Stunden die Werte

$$\bar{d} = 212,4$$

$$s = 413,1$$

ergeben.

Bei einer Sicherheitswahrscheinlichkeit $1 - \alpha = 95\%$ ist

$$t_{95\%}^{(45)} = 1,679$$

95%

Damit ist $\frac{\bar{d}}{s} \cdot \sqrt{n} = 4,13 > 1,679 = t_{95\%}^{(45)}$ und die Hypothese H_0

ist zugunsten von H_1 abzulehnen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 95%.

II. Schritt: Für die Schätzfunktion f ergibt sich nach der

2. Stunde: $f = \bar{x} - \bar{y} = 717,4 - 502 = \underline{215,4}$

III. Schritt: Zur quantitativen Aussage nach der 2. Stunde

ergibt sich: $\bar{d} - t_{95\%}^{(45)} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} = \underline{112,5}$

5.6. In Zusammenarbeit mit Dr. Schill, Andrologisches Labor¹, war es uns möglich, in 2 Labors unabhängig voneinander die in-vitro Ergebnisse einer kallikreininduzierten Stimulation der Spermienmotilität im Ejakulat (quantitative und qualitative Motilität) von 14 Versuchen mit den Ergebnissen der Zervixmucuspennetration unter Verwendung desselben Ejakulats und Zervixmaterials zu vergleichen. Die Zunahme der mit 1 ME/ml stimulierten Spermatozoen betrug nach der 1. Stunde 87% für die qualitative und 54% für die quantitative Motilität sowie 82% für die Gesamtpennetrationsstrecke. Die 2-Stundenwerte lagen entsprechend bei 89% qualitative Motilität, 63% quantitative Motilität und 64% für die Gesamtpennetrationsstrecke, vgl. Abb. 3a und 3b. Für den Korrelationskoeffizienten zwischen der Gesamtpennetrationsstrecke im Zervixmucus und der quantitativen Motilität errechneten wir nach der 1. Stunde einen Wert von 0,64, nach der 2. Stunde von 0,61.

5.7. Übereinstimmend mit theoretischen Überlegungen bewirkte die Kininase Carboxypeptidase B eine signifikante Hemmung (s. Abb. 4). Bei den mit Carboxypeptidase B behandelten Sperrieri ergab sich nach der 1. Stunde eine Abnahme von 40,5%, nach der 2. Stunde von 34,6% und nach der 4. Stunde um 41,7% bezogen auf den Mittelwert der Gesamtpenetrationsstrecke aller 8 Versuche gegenüber den Kontrollspermien (s. Tab. 2). Für die Gesamtpenetrationsstrecke nach der 1., 2. und 4. Stunde ergaben sich 24530 cm bei den Kontrollspermien und 15174 cm bei den mit Carboxypeptidase B behandelten Spermatozoen, was einer Abnahme um 38,3% entspricht.

5.8. Ergebnisse des Student-t-Tests für 8 Versuche mit Carboxypeptidase B als Testsubstanz.

Wir können auch hier mit Hilfe der Schritte I, II und III die Aussage machen, daß ein signifikanter qualitativer und quantitativer Unterschied zwischen dem Testansatz und dem Kontrollansatz besteht, besonders bei den 2 und 4 Stunden Werten. Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt wieder bei 5%.

5.9. Auswertung nach dem Student-t-Test von 8 Versuchen mit Carboxypeptidase B als Testsubstanz.

	1. Stunde	2. Stunde	4. Stunde
I. Schritt:			
Für die Größen $\bar{d}$ und s ergibt sich	$\bar{d} = 259,3$	347	407,7
bei einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von	$s = 315,9$	361,5	349,2
$1 - \alpha = 95\%$ und			
$t_{(8)}^{95\%} = 2,306$			
$\frac{\bar{d}}{s} \cdot n = \dots$	$2,489 > 2,306$	$2,889 > 2,306$	$3,596 > 2,306$

Ist diese Gleichung erfüllt so gilt:

Hypothese H ist zugunsten von K abzulehnen.

1. Stunde

2. Stunde

4. Stunde

II. Schritt:

Für die Schätz-
funktion f er-
gibt sich:

$$f = \bar{x} - \bar{y} \quad 259,3 \text{ cm} \quad 347 \text{ cm} \quad 407,7 \text{ cm}$$

f gibt die
Differenz der
Penetrations-
strecken im
Mittel an

III. Schritt:

Quantitative Aus-
sage

$$\bar{d} - t_{95\%}(n-1) \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} = d \quad 17,3 \text{ cm} \quad 69,8 \text{ cm} \quad 130,2 \text{ cm}$$

d ist der Erwartungswert der mit 95% Wahrscheinlichkeit größer als der erhaltene Wert für $\bar{d}$ ist.

5.10. Dagegen zeigte Trasylol-gehemmtes Kallikrein weder nach der 1. und 2., noch nach der 4. Stunde einen Stimulations-effekt (s. Abb. 4). Bei den Trasylolbehandelten Spermatozoen ergab sich nach der 1. Stunde eine geringe Abnahme von 7,2%, nach der 2. Stunde um 15,2% und nach der 4. Stunde um 13,2% bezogen auf den Mittelwert der Gesamtpenetrationsstrecke aller 8 Versuche gegenüber den Kontrollspermien (s. Tab. 3). Die Kontrollspermien zeigten insgesamt nach 4 Stunden eine Gesamtstrecke von 24.530 cm gegenüber 21.433 cm der mit 1 KE+ 5 KIE Trasylol/ml behandelten Spermien zurück, was einer leichten Abnahme um 12,7% entspricht.

5.11. Ergebnis des Student-t-Tests für 8 Versuche mit Trasylol als Testsubstanz.

Da wir mit dem I. Schritt nicht die Hypothese H zugunsten von K

ablehnen können, besteht zwischen der Test- und Kontrollsubstanzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% kein signifikanter qualitativer Unterschied. Damit entfallen auch die Schritte II und III.

5.12. Auswertung nach dem Student-t-Test von 8 Versuchen mit Trasylool als Testsubstanzen.

	1. Stunde	2. Stunde	4. Stunde
I. Schritt:			
Für die Größen $\bar{d}$			
und s ergibt sich	$\bar{d} = 45,3$	157,8	141,3
bei einer Sicher-			
heitswahrschein-			
lichkeit von	$s = 91,8$	256,4	259,1
$1 - \alpha = 95\%$ und			
$t(8) = 2,306$			
95%			
$\frac{\bar{d}}{s} \cdot n = \dots$	$1,48 > 2,306$	$1,845 > 2,306$	$1,635 > 2,306$

Die Gleichung wird bei keinem Stundenwert erfüllt .

5.13. Der Variationskoeffizient aller 46 Versuche mit Kallikrein als Testsubstanzen beträgt im Durchschnitt 13,8% (2,8% - 35%). Bei Carlborg (4) liegt der Variationskoeffizient zwischen 3,3% - 26,8%.

Tab. 1 Prozentuale Zu- bzw. Abnahme der Penetrationsstrecken bei 46 mit 1 KE/ml Ejakulat behandelten Versuchen gegenüber der Kontrolle.

1. Stunde	2. Stunde	Mittelwert	
%		1.+ 2. Stunde	%
+ 175	+ 176,0	60,9m	60,9%
+ 123,9	+ 140		
+ 35,7	+ 41,2		
+ 67,3	+ 65		
+ 161,4	+ 79,2		
+ 39,2	+ 37,7		
+ 59	+ 48,5		
+ 63,6	+ 46,1		
+ 52,8	+ 75,3		
+ 94,3	+ 132		
+ 44,7	+ 47,4		
+ 245	+ 119,7		
+ 71,1	+ 84,2		
+ 111,1	+ 86,2		
+ 117,2	+ 137,7		
+ 125	+ 94,9		
+ 341,1	+ 945,1		
+ 148,6	+ 80		
+ 10,6	+ 108,5		
+ 82,1	+ 54,9		
+ 116,2	+ 183,6	34,8m	33,7%
+ 112,9	+ 105		
+ 555,6	+ 1235,5		
+ 273,3	+ 333,3		
+ 518,4	+ 466,7		
+ 62,5	+ 49,2		
+ 51,6	+ 13,5		
+ 71,9	+ 20		
+ 7,4	+ 5,0		
+ 7,7	+ 75,7		
+ 7,3	- 10,9	4,3%	5,4%
+ 5,1	- 6,5		
+ 22,6	- 18,8		
+ 10,4	+ 4,8		
- 4	+ 5		
- 15,5	- 21,7		
- 32,7	- 20,2		
+ 4,5	- 11,4		
+ 2,5	- 4,3		
+ 17,6	- 14,7		
+ 5,4	+ 10,1	4,3%	5,4%
+ 3,5	- 4,2		
- 35,6	- 26,3		
- 25,8	- 30,3		
- 58,8	- 79	4,3%	5,4%
	- 53,6		

32,6%

6,5%

Tab. 2

CARBOXYPEPTIDASE B

	1.Std.	2.Std.	4.Std.	1.,2.,4.St
Anzahl der Versuche: 8				
Gesamtpenetrations- strecke in cm :				
a) Kontrollspermato- zoen	5600	9375	9555	24530
b) Mit 2U Carboxy- peptidase B be- handelte Spermato- zoen	3338	6251	5585	15174
c) Prozentuale Differenz zwischen a) und b)	- 40,5%	- 34,6%	- 41,7%	- 38,3%
Darstellung der Schwankungsbreite die sich ergibt, wenn man in jeder einzelnen Testreihe den prozentualen Unterschied zwischen Kontroll- und Test- substanz angibt	- 29,4% bis - 64,8%	- 31,1% bis - 55,3%	- 31,7% bis - 84,2%	

Tab. 3

TRASYLOL

	1.Stunde	2.Stunde	4.Stunde	1.,2.,4.Stunde
Anzahl der Versuche 8				
Gesamtpenetrations- strecke in cm :				
a) Kontrollspermien	5600	9375	9555	24530
b) Mit Kallikrein (1 KE) + Trasylool (5 KIE) behandelte Spermien	5196	7954	8283	21433
c) Prozentuale Differenz zwischen a) und b)	- 7,2%	- 15,2%	- 13,2%	- 12,7%
Darstellung der Schwankungsbreite die sich ergibt, wenn man in jeder einzelnen Test- reihe den prozent- ualen Unterschied zwischen Kontroll- und Testsubstanz angibt	- 2,6% bis - 8,7%	- 9,8% bis - 17,9%	- 4,1% bis - 24,8%	

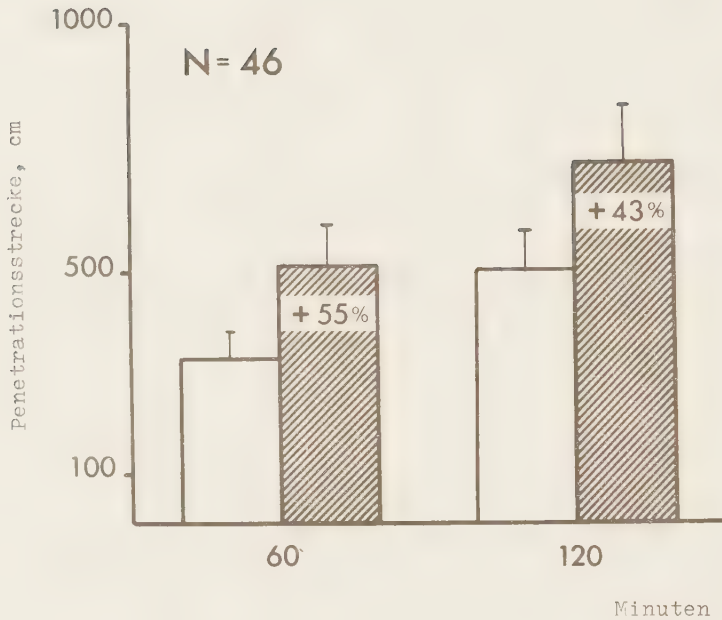


Abb. 1 : Prozentuale Differenz, die sich aus dem Mittelwert der Penetrationsstrecke von 46 Versuchen zwischen unbehandelten Spermatozoen und mit 1 KE/ml Ejakulat behandelten Spermatozoen nach 60 und 120 Minuten ergibt.

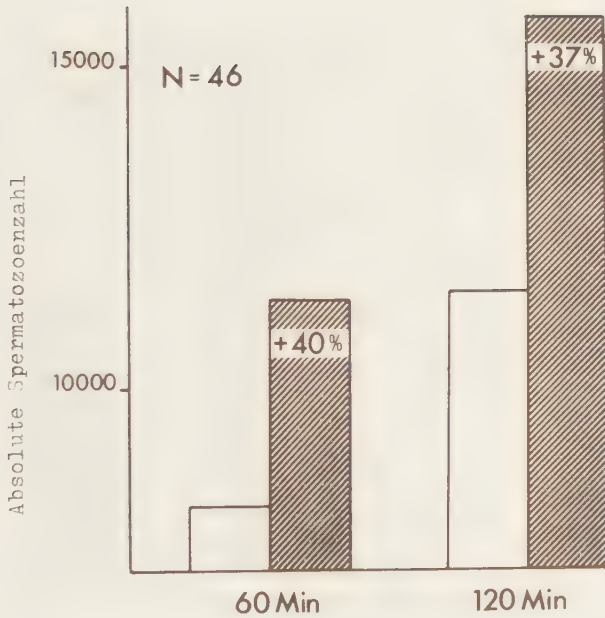


Abb. 2 : Absolute Zahl der Spermatozoen bei einer Penetrationsstrecke von 2 cm nach 60 und nach 120 Minuten. □ unbehandelte Spermatozoen, ▨ mit 1 KE/ml Ejakulat behandelte Spermatozoen.

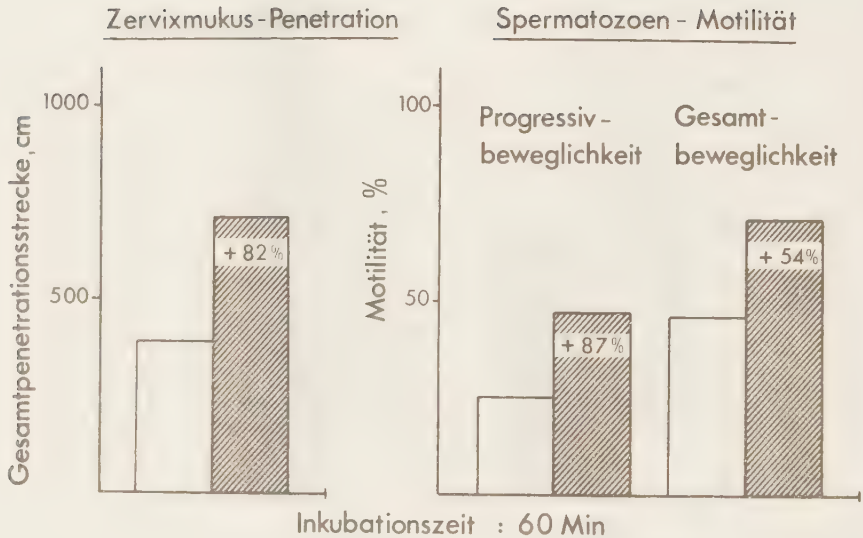


Abb. 3a : Vergleich zwischen der prozentualen Zunahme der mit 1 KE/ml Ejakulat induzierten Stimulation der qualitativen und quantitativen Spermatozoenmotilität einerseits, mit der prozentualen Zunahme der Gesamtpenetrationsstrecke bei der Zervixmucuspenetration andererseits nach 60 Minuten.

Zahl der Versuche: 14

□ unbehandelte Spermatozoen

▨ mit 1 KE/ml Ejakulat behandelte Spermatozoen

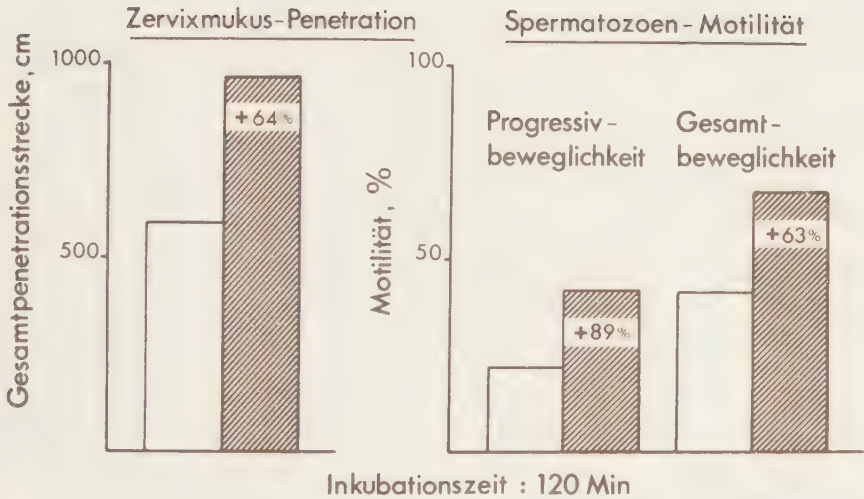


Abb. 3b : Vergleich zwischen der prozentualen Zunahme der mit 1 KE/ml Ejakulat induzierten Stimulation der qualitativen und quantitativen Spermatozoenmotilität einerseits, mit der prozentualen Zunahme der Gesamtpenetrationsstrecke bei der Zervixmucuspenetration andererseits nach 120 Minuten.

Zahl der Versuche: 14

☐ unbehandelte Spermatozoen

☒ mit 1 KE/ml Ejakulat behandelte Spermatozoen

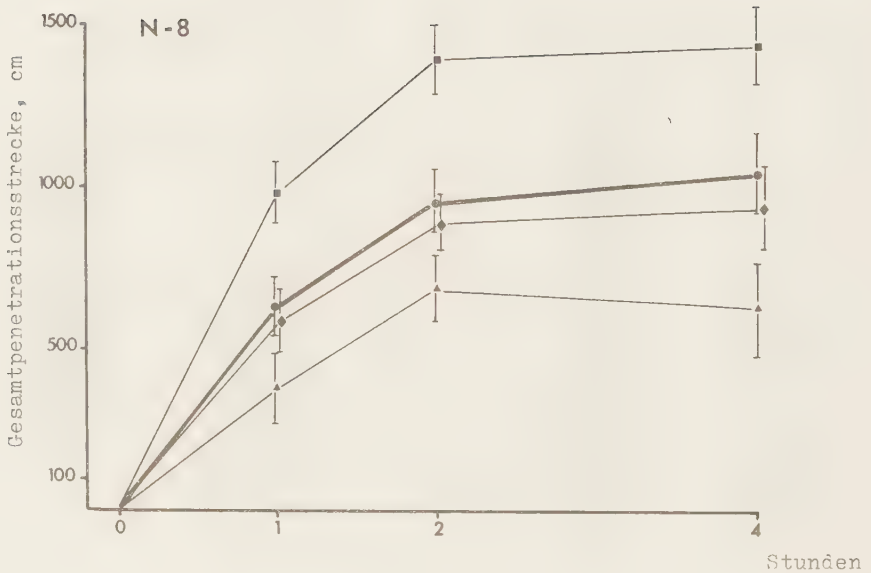


Abb. 4 : Vergleich der Gesamtpenetrationsstrecken von nicht behandelten Spermatozoen °-°-°, mit solchen die mit 1 KE/ml Ejakulat ■-■-■, bzw. mit 1KE + 5 KIU/ml Ejakulat ◆-◆-◆, bzw. mit ▲-▲-▲ 2 U/ml Ejakulat Carboxypeptidase B behandelt wurden. Nach der 1., 2. und 4. Stunde.

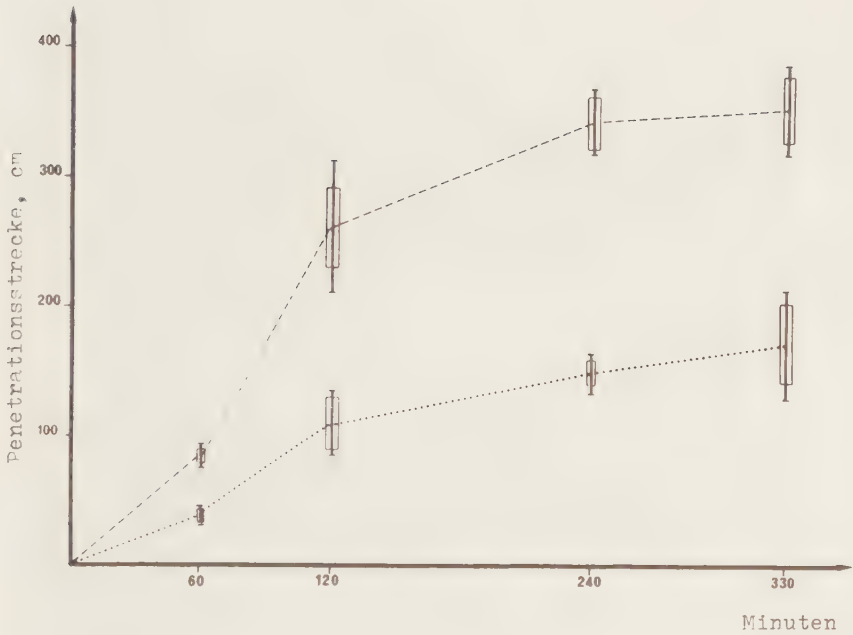


Abb. 5 : Kallikreinbedingte Stimulation der Spermatozoen im Zervixmucuspenetrationstest — 1 typischer Versuch. Abszisse: Zeit in Minuten. Ordinate: Penetrationsstrecke in cm.

----- 1 KE/ml Ejakulat

..... nicht behandelte Spermatozoen

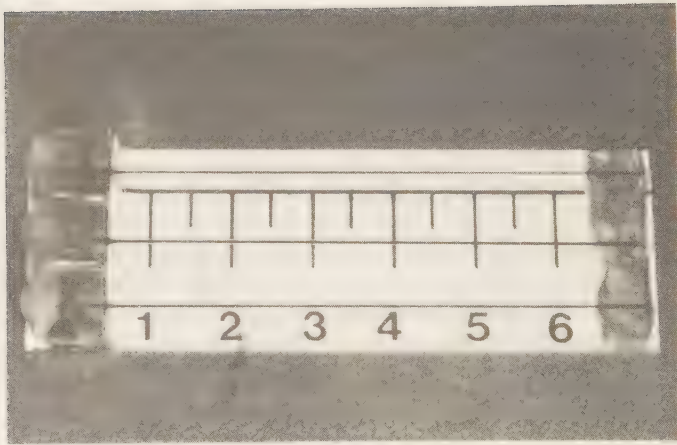


Abb. 6 : Modifizierter Kapillarrohrtest nach Kremer.

Linke Bildseite: Ejakulatbehälter mit Auflage-
vorrichtung für die Kapillarröhrchen.

Rechte Bildseite: Plastilin zur Befestigung der
Kapillarröhrchen.

Die Meßskala in cm wurde zur besseren Veranschau-
lichung auf Papier aufgezeichnet, während wir bei
den Versuchen wasserfesten Tesafilm und Filzstift
verwendeten.



Abb. 8 : Ovulatorischer Zervixmucus mit paralleler Anordnung der Muzinfäden und einem lockeren Muzinnetzwerk mit relativ wenig Querverbindungen.
14. Tag eines 28-tägigen Zyklus. Elektronenmikroskopische Aufnahme 11000-fach vergrößert.

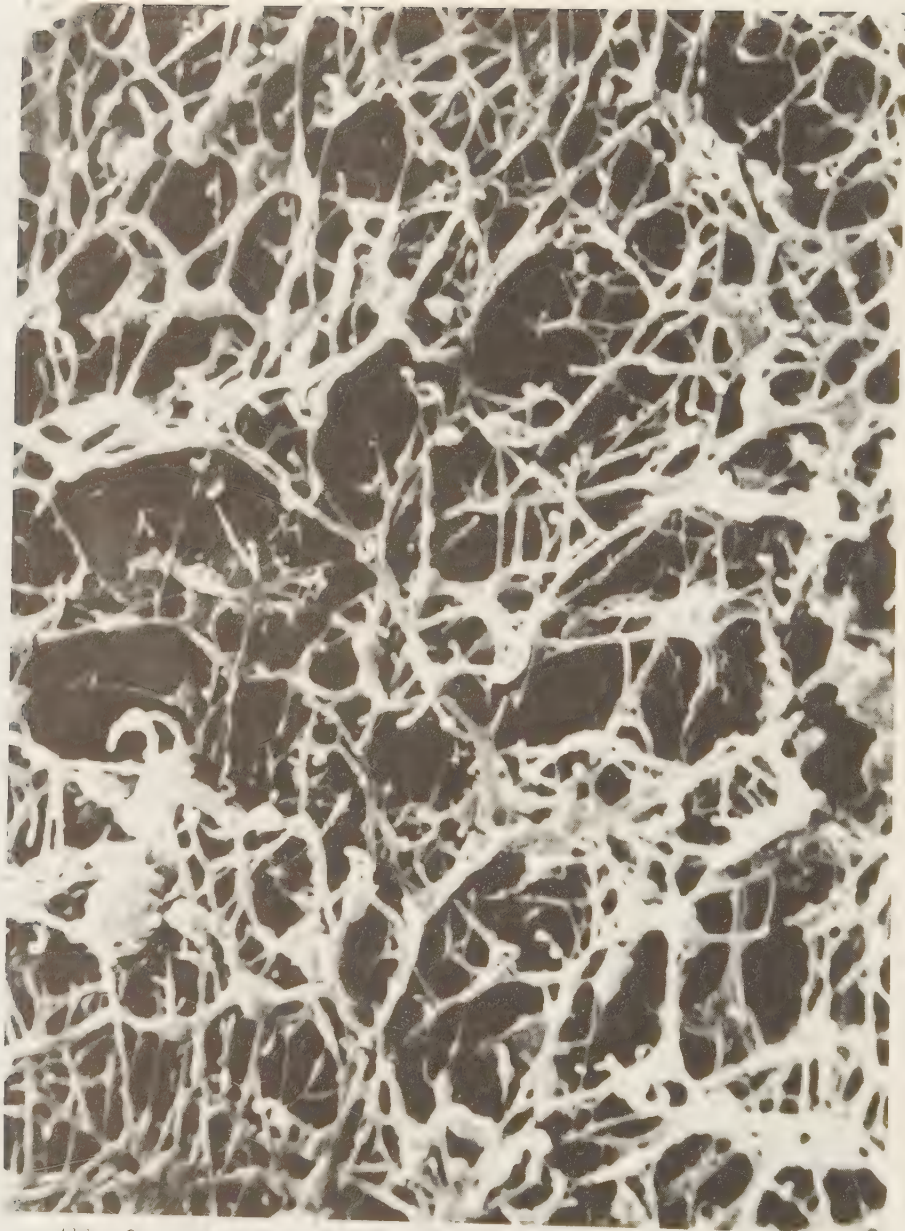


Abb. 9 : Gestagener Zervixmucus vom Typ G mit dichtem Netzwerk und vielen Querverbindungen zwischen den Makromolekülen. Die Mizellenanordnung fehlt fast völlig.

22. "und einen 12-13-jährigen Zervixmucus, der einen
"makromolekularen" Charakter 12-13-jährig vorprägend.

6. DISKUSSION

6.1. Vergleich verschiedener In vitro Zervixmucus-Spermatozoen-Penetrationstests.

Die Spermatozoenpenetration durch den Zervixmucus kann unmittelbar post coitum durch in vivo Tests verfolgt werden. Allerdings erlaubt dieser Test nur eine grobe Schätzung der Spermienmigration und stellt kein objektives Maß dar für die Penetration durch das Zervixsekret. Andererseits stimmen die Beobachtungen beim post coitum Test sehr gut mit den Ergebnissen der in vitro Penetrationstests überein (7).

Viele in vitro Testmethoden wurden entwickelt unter Verwendung eines Objektträgers oder der Kapillarrohrtechnik.

Während der Kurzrok-Miller-Test für den Kliniker geeignet erscheint, stellte sich dieser Test für unsere Versuche aus folgenden Gründen als unzuverlässig heraus:

1. Es kann kein guter Kontakt zwischen Mucus und Ejakulat erreicht werden.
2. Die unterschiedliche Dicke des Mucusfadens macht einen Vergleich zwischen den Kontroll- und Testexperimenten unmöglich.
3. Die Gefahr der Mucuseintrocknung bei 2-stündiger Inkubation (37° C) ist ebenfalls sehr groß.
4. Hinzu kommt, daß sich die Entfernung der bis zu einer definierten Ablesemarke penetrierten Spermien wegen der ungleichen Ausgangskontaktpunkte zwischen Mucus und Spermien nicht bestimmen läßt und somit standardisierte Versuchsbedingungen nicht gegeben sind.

Wir verwendeten daher bei unseren Experimenten den Kapillarrohrtest nach Kremer (25) s. Abb. 6 . Da über die Brauchbarkeit dieser Methode und mehrerer Modifikationen davon keine genaueren Untersuchungen bekannt sind, sollten folgende Erwägungen diskutiert werden. Nach Beobachtungen von Odeblad kann man zwischen dem Zervixplasma und der Gelphase dadurch unterscheiden, daß letztere nicht in ein Kapillarröhrchen aspiriert werden kann. Nach Nakamura (8) erhebt sich nun die Frage, wie dann die genaue Zusammensetzung der aspirierten

Substanz ist, die die Penetration der Spermatozoen ermöglicht. Um eine definitive Aussage darüber zu erhalten, müßten entsprechende histologische und biochemische Untersuchungen angestellt werden. Da wir jedoch präovulatorischen Mucus mit der geringstmöglichen Viskosität verwendeten, ist die Wahrscheinlichkeit, nur die Plasmaphase des Mucus aspirieren zu können, sehr gering. Dagegen spricht auch, daß wir zur Bestimmung der Spinnbarkeit ein mit Mucus gefülltes Kapillarröhrchen in der Mitte zerbrachen und über einem Lineal die Spinnbarkeit maßen — wären nur Bestandteile der Plasmaphase in den Kapillarröhrchen gewesen, so hätte die Spinnbarkeit nie über 8 cm liegen können. Als nachteilig beim Kremertest erwies sich nur die Schwierigkeit des Ablesens der Spermatozoenzahl im Randbereich der Kapillaren wegen der durch die Kapillardicke bedingten Randerscheinungen. Für unsere Tests ist dieser Ablesefehler jedoch nur von geringer Bedeutung, da er sowohl bei den Kontrollröhrchen als auch bei den Teströhrchen gemacht wurde und sich auch durch die Zahl der Versuche ausgleicht.

Ein Vorteil des Kremertests ist es, daß mehrere Parameter der Penetration, wie Anzahl der Spermatozoen an einer bestimmten Ablesemarke, Dichte und Motilität der Spermatozoen festgelegt werden können. Er kann leicht für klinische Zwecke (25, 33) durchgeführt werden und eignet sich gut als Verlaufskontrolltest. Die Gefahr der Mucuseintrocknung ist nicht gegeben, der Mucusverbrauch nicht so groß wie z.B. bei der von Bergman und Ferbas (1) angegebenen Testmethode und außerdem ist ein guter Kontakt zwischen Ejakulat und Mucus sicherstellt. Das Phalangenphänomen wird nur selten bei ovulatorischem Mucus gefunden (33). Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß der Mucus nicht am gleichen Tag verwendet werden muß.

6.2. Erläuterungen zur Beurteilung der Standardabweichung und der Mittelwerte einzelner Tests.

Die Standardabweichung innerhalb einer Testreihe (d.h. je 4 Röhrchen unter gleichen Bedingungen) war meist nicht groß (1,4% - 17,5% vom Mittelwert), doch gab es bei vier Ver-

suchen Standardabweichungen, die nahezu die Größe der Mittelwerte (d.h. 80%- 90% vom Mittelwert) erreichten. Für die Beurteilung dieser Tests ergaben sich jedoch keine Probleme, weil jeweils die Mittelwerte von Test- und Kontrollpenetrationsstrecke miteinander verglichen wurden. Die gewonnenen Mittelwerte der Gesamtpenetrationsstrecke für eine Testreihe unterschieden sich bei den 46 Versuchen erheblich, da das Ejakulat und der Zervixmucus bei jeder Testreihe individuellen Schwankungen unterlag.

In unseren Experimenten fanden wir einen Variationskoeffizienten von nur 13,8% im Durchschnitt (2,8% - 35%). Das stimmt gut mit den Untersuchungen von Carlborg (4) überein, der einen Variationskoeffizienten von 3,3% - 26,8% angibt.

6.3. Die Wirkung von kallikreinbehandelten Ejakulaten mit Oligozoospermie und eingeschränkter Motilität auf den Zervixmucuspentrationstest.

Zweck der Untersuchungen war es, den Effekt des Kallikrein-Kinin-Systems, insbesondere von Kallikrein, auf die Spermatozoenpenetration im Zervixmucus zu studieren. Die Verwendung von oligozoospermen Ejakulaten mit eingeschränkter Spermatozoenmotilität erbrachte eine signifikante Zunahme der in vitro Spermienpenetration durch den ovulatorischen Zervixschleim. Die Verbesserung der Spermatozoenmigration durch Kallikrein erhärtet die Beobachtungen von Schill, der bei in vitro Tests, nach Zugabe von Kallikrein, Motilitätssteigerungen bei Ejakulaten mit Oligo- und Asthenozoospermie fand (49,50, 51 , 52). Bei 65 unterschiedlichen Ejakulaten mit Astheno- oder Oligozoospermie mit einer Spermienmotilität von 30-50% konnte Schill nach Kallikreinbehandlung (52) im Durchschnitt eine Zunahme der quantitativen Motilität um 40% nach 2 Stunden feststellen. Analog dazu fanden wir eine Zunahme der Gesamtpenetrationsstrecke nach 2 Stunden um 42,9%. Die qualitative Motilitätssteigerung betrug bei den Experimenten von Schill sogar im Durchschnitt 59% nach 2 Stunden. Zwischen der Zunahme der Spermienmotilität und der Zunahme der Penetrationsstrecke bei mit Kallikrein stimulierten

Ejakulaten ließ sich ein Korrelationskoeffizient von 0,64 bezüglich der quantitativen Spermienmotilität und von 0,54 bezüglich der qualitativen Spermienmotilität nach der ersten Stunde errechnen. Eine ähnliche Korrelation zwischen der Zunahme der Spermienmotilität und der Zunahme der Penetrationsstrecke bei allerdings unbehandelten Ejakulaten fand auch Ulstein als Ergebnis heraus (60). Diese zu beobachtende Korrelation zwischen der Spermienmotilität und der Spermienmigration weist darauf hin, daß zusätzliche Faktoren beteiligt sein müssen, die ausschließlich auf die Penetration, nicht dagegen auf die Motilität wirken und umgekehrt.

Bei der Untersuchung des Penetrationsverhaltens der Spermatozoen jedes einzelnen Ejakulats fiel auf, daß 33,7% der Ejakulate keine Verbesserung der Zervixmucuspénétration durch den Zusatz von Kallikrein zeigten, während bei 60,9% der Ejakulate eine durchschnittliche Steigerung der Zervixmucuspénétrationsstrecke von 108,8% gefunden wurde. Diese Befunde deuten auf das Vorhandensein von zwei Gruppen von oligozoospermen Ejakulaten mit eingeschränkter Motilität hin, nämlich solche, die positiv reagieren und solche, die nicht auf den Kinineffekt ansprechen und wahrscheinlich bereits irreversible Störungen des Spermatozoenmetabolismus aufweisen. Es wäre aber auch denkbar, daß der Kininasespiegel im Seminalplasma und im Zervixmucus eine Rolle spielt.

6.4. Die Wirkung von Coffein auf Ejakulate mit Oligozoospermie und eingeschränkter Motilität und auf den Zervixmucuspénétrationstest.

Wir haben auch 3 Versuche mit Coffein, einem Hemmstoff der zyklischen Nukleotidphosphodiesterase, durchgeführt. Den Ergebnissen einiger Wissenschaftler zufolge (20, 58, 54) stimuliert Coffein die Spermatozoenmotilität. Bei uns zeigte sich nur nach der ersten, nicht dagegen nach der zweiten Stunde nach Stimulation durch Coffein eine signifikante Zunahme der Gesamtpénétrationsstrecke. Der Kallikreineffekt war dagegen nach 2 Stunden noch wesentlich deutlicher. Coffein wurde in der von Schoenfeld (58) angegebenen Pufferlösung zugesetzt.

Schill konnte bei seinen Versuchen mit Coffein eine sofortige Stimulation der Spermienmotilität, die über einen Beobachtungszeitraum von etwa 2 Stunden relativ konstant blieb, beobachten. Während die Wirkung von Coffein sehr schnell einsetzte, wirkte Kallikrein erst nach einer Latenzperiode von 1-2 Stunden optimal (54). Dafür dauerte die Wirkung von Kallikrein länger, nämlich 24 Stunden an. (54), während die Wirkung von Coffein nur bis zu 5 Stunden anhielt (58, 54). Möglicherweise ist die kürzere Wirkungsdauer von Coffein der Grund dafür, weshalb wir nach der 2. Stunde keine signifikante Zunahme der Penetrationsstrecke mehr fanden.

6.5. Gründe, die für das Vorhandensein von Kininen im Ejakulat sprechen.

Kallikrein kann nur wirksam werden, wenn es nicht durch einen Inhibitor (z.B. Trasylol) bzw. durch Säuredenaturierung blockiert wird. Darüber hinaus ist die Anwesenheit von Kininogen Voraussetzung. Daraus folgt aber schon, daß Kininogen normaler Bestandteil des Seminalplasmas ist, andernfalls wäre eine Zugabe von Kallikrein ohne Effekt. Die Vermutung, daß Kinine die Spermienmotilität erhöhen wird durch die Tatsache bewiesen, daß die kinininduzierte Stimulation der Spermienmotilität durch die Zugabe von Carboxypeptidase B , einer potenten Kininase, aufgehoben wird (52).

6.6. Hypothese über die Wirkung von Kallikrein.

Den möglichen Wirkungsmechanismus des Kallikreins auf die Spermienstimulation kann man sich nach Fritz und Schill so vorstellen (51):

Die kinininduzierte Zunahme der Spermienmotilität könnte aufgrund von Permeabilitätsänderungen der Membransysteme der Spermatozoen oder durch Einwirkungen auf den intrazellulären Metabolismus sowie Einwirkungen auf Transportprozesse zustande kommen.

Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, daß das Kallikrein-Kinin-System an Permeations- und Absorptionsprozessen be-

teiligt ist (39, 9). Meng und Haberland (32) konnten bei Versuchen am Rattenintestinum zeigen, daß unter dem Einfluß von Kallikrein (ähnlichen Dosen wie in unseren Versuchen) die Glukoseabsorption zunahm im Vergleich zu den Versuchen ohne Kallikreinzusatz. Daher liegt die Vermutung nahe, daß die Zunahme der Spermienmotilität durch Kallikrein, das seinerseits die Abspaltung von Kininen aus Kininogen bewirkt, auf eine vermehrte Absorption von energetisch verwertbaren Substraten, zurückzuführen ist. Schill (52, 55) konnte darüber hinaus nachweisen, daß neben der Stimulation der Spermienmotilität durch Kallikrein auch eine signifikante Zunahme der Fruktolyse stattfindet, was wiederum für eine Aktivierung des Spermatozoenmetabolismus spricht. Gleichzeitig gelang es Leidl (27) zu zeigen, daß der Sauerstoffverbrauch von kallikreinstimulierten Spermatozoen erhöht ist.

Eine Beziehung zwischen Kininrezeptoren und Adenylzyklase ist ebenfalls denkbar, da das cyclo-AMP nach neueren Untersuchungen eine Bedeutung bei der Stimulierung der Spermatozoenmotilität bei Affen und beim Menschen besitzen soll (20, 15, 5). In diesem Zusammenhang ist sehr interessant, daß direkt zu gewaschenen Spermien zugesetztes cyclo-AMP die Spermienmotilität nicht wesentlich erhöht (20), man jedoch in Kombination mit Coffein bei Bullenspermien eine gute Stimulation der Spermienmotilität findet (20).

6.7. Wirkung von Carboxypeptidase B auf die Zervixmucuspénétration.

Die Zervixmucuspénétration wurde signifikant durch die Zugabe von Carboxypeptidase B zum Ejakulat verringert. Wir haben das erwartet, da Carboxypeptidase B eine sehr effektive Kininase ist und sowohl die quantitative als auch die qualitative Motilität der Spermien senkt (52). Andererseits zeigten diese Versuche auch, daß die Kinine für die Stimulation der Spermienmotilität verantwortlich sein müssen.

6.8. Wirkung von Trasylol auf die Zervixmucuspenetration.

Es ergab sich keine Stimulation der Spermatozoenmigration durch den Zervixmucus, wenn Vallikrein zum Ejakulat zugesetzt wurde, welches zuvor durch Trasylol inhibiert worden war. Die leichte Abnahme der Gesamtpenetrationsstrecke läßt sich am ehesten damit erklären, daß Trasylol im Überschuß zu einer Kallikreineinheit gegeben wurde und dadurch das physiologisch im Seminalplasma vorhandene Kallikrein gehemmt wurde.

6.9. Die Wirkung von Kininogen auf die Zervixmucuspenetration.

Kininogen, das physiologische und spezifische Substrat für Kallikrein, ist im Zervixmucus vorhanden (52). Wir führten 3 Versuche mit Kininogen (0,1 ng/ml Ejakulat) plus eine Kallikreineinheit im Mucuspenetrationstest durch. Ähnlich wie Schill (51, 52), der das schon für die qualitative und quantitative Motilität beschrieben hat, fanden wir eine zusätzliche Steigerung der Gesamtpenetrationsstrecke um 30% gegenüber der nur mit Kallikrein behandelten Spermatozoen.

6.10 Abschließende Betrachtungen

Palm und Schill (45) konnten vor kurzem nachweisen, daß auch Prostaglandin E_2 bei asthenozoospermien Ejakulaten in Konzentrationen von 50-100 ng eine Motilitätssteigerung bedingt. Die Wirkdauer ist allerdings nur relativ kurz, etwa 1 Stunde. Auch andere Wissenschaftler konnten mit Prostaglandin E_2 Spermatozoenmotilitätssteigerungen zeigen (11).

Die Zervixmucuspenetration liefert wahrscheinlich die beste Information über die Befruchtungsfähigkeit und die Eigenschaften des Ejakulats (62). Jedoch kann die Aussage eines in vitro Tests über den Fertilitätszustand des Mannes niemals endgültig sein. Die Frage, ob die Fertilitätskapazität von

- - -

Spermatozoen, die auf diese Weise stimuliert wurde, zunimmt, kann nur durch klinische Studien geklärt werden. Die Anwendung von Kallikrein bei der künstlichen Insemination schließt die Berücksichtigung von genetischen Problemen in Verbindung mit solchen klinischer Studien ein, da die Spermatozoen geringerer Qualität möglicherweise durch die Wirkung von Kallikrein dazu befähigt werden, durch den Zervixmucus zu penetrieren. Erst kürzlich zeigte dagegen Gropp (17), daß pathologische Spermatozoen im cavum uteri zerstört werden, bevor sie den Uterustubengewinkel erreichen, ein Hinweis dafür, daß nur morphologisch einwandfreie Spermatozoen bis zur Stelle der Befruchtung vordringen können.

Die Insemination mit Kallikrein-stimulierten Spermatozoen des Ehepartners könnte für die Behandlung der männlichen Unfruchtbarkeit von Wert sein. Es ist allerdings eine sorgfältige Auswahl der Ehepaare gemäß der Richtlinien unserer in vitro Versuche angezeigt.

Abschließend sollte noch einmal betont werden, daß die Bestimmung der in vitro Penetration im Zervixmucus das beste Kriterium zur Beurteilung der Fertilitätsprognose eines infertilen Paares zu sein scheint.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Wir untersuchten mit dem leicht modifizierten Kremer Test Ejakulate mit Oligozoospermie und eingeschränkter Motilität. Dabei interessierte uns die Wirkung von Kallikrein-stimulierten Spermatozoen gegenüber unbehandelten Spermatozoen auf die Gesamtpenetrationsstrecke im Zervixmucus. Es stellte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Gesamtpenetrationsstrecke Kallikrein-stimulierter Spermatozoen und unbehandelter Spermatozoen heraus. Mit dem Student-t-Test konnten wir nachweisen, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%, daß sowohl ein qualitativer als auch ein quantitativer Unterschied im Verhalten von Kallikrein-stimulierten gegenüber unbehandelten Spermatozoen besteht. Die absolute Anzahl der Spermatozoen bei der definierten Ablesemarke im Spermatozoenpenetrationstest von 2 cm differierte erheblich zwischen Kallikrein-behandelten und unbehandelten Spermatozoen. Es zeigte sich eine mäßige Korrelation zwischen der qualitativen und quantitativen Spermatozoenmotilität und der Zervixschleimpenetrationsstrecke Kallikrein-stimulierter Spermatozoen. Trasylolgehemmtes Kallikrein zeigte keinen Stimulationseffekt. Carboxypeptidase B bewirkte eine Abnahme der Spermatozoenmotilität und der Gesamtpenetrationsstrecke im Zervixschleim. Andere Substanzen, die die Spermatozoenmotilität ebenfalls erhöhen, wurden weniger ausführlich mituntersucht. Der mögliche Wirkungsmechanismus des Kallikrein-Kinin-Systems wurde diskutiert. Auf die mögliche Anwendung von Kallikrein zur homologen Insemination bei infertilen Ehepaaren haben wir hingewiesen.

8. INDICATORVEPPEICHNIS

- 1) Bergmann, P., E. Ferbas :
A test for sperm migration analysis in an
arteficial medium
Int. J. Fert. 6, 279 (1961)
- 2) Bhoola, K.D., R. May May Yi, J. Morley, M. Schachter:
Kinin-releasing enzyme in the accessory sex glands
of the guinea-pig
J. Physiol. (Lond.) 159: 34-35P (1961)
- 3) Botella-Illusa, J.:
Measurement of linear progression of the human
spermatozoa as an index of male fertility
Int. J. Fert. 1, 113 (1956)
- 4) Carlberg, L.:
Determination of sperm migration rate in small
samples of cervical mucus
Acta Endocrinologica 62, 732 (1969)
- 5) Casillas, E.R., D.D. Hoskins:
Adenyl-cyclase activity and cyclic 3',5'-AMP
content of ejaculated monkey spermatozoa
Arch. Biochem. Biophys. 147. S. 148-155 (1971)
- 6) Cohen, M.R., J.F. Stein, B.M. Kaye:
Spinnbarkeit: A Characteristic of Cervical Mucus.
Significance at Ovulation Time
Fert. and Ster. 3. S. 201 (1952)
- 7) Davajan, V., G.M. Kunitake:
Fractional in-vivo and in-vitro examination of
postovital cervical mucus in the human
Fert. and Ster. 20, 197 (1969)
- 8) Davajan, V., R.M. Nakamura:
The in vitro sperm-cervical mucus testing systems
In: Cervical mucus in human reproduction.
World Health Organization Colloquium Geneva 1972
Chapter 12, pp. 153-161

- 9) Dennhardt, R., F.J. Haberich:
Effect of Kallikrein on the absorption of water,
electrolytes, and hexoses in the intestine of rats
In: Kininogenases-Kallikrein 1 (edited by G.L.
Faberland & J.W. Rohen) pp. 81-88
Schattauer Verlag, Stuttgart, New York 1973
- 10) Eisen, V., V. Vogt:
Kininogenases
In: Bradykinin, Kallidin and Kallikrein (edited by
E.G. Erdös), Handbook of Pharmacology, Vol. XXV.,
pp. 82-130
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1970
- 11) Eskin, B.A., S. Azarbal, R. Sepic, and W.G. Slate:
In vitro responses of spermatozoa-cervical mucus
system treated with Prostaglandin ($F_{2\alpha}$)
Obstetric Gynecology 41, S. 436-439 (1973)
- 12) Frey, E.K., H. Kraut, E. Werle:
Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren
S. 10-11 2. Auflage 1968
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart
- 13) Frey, E.K., W. Hartenbach, F. Schultz:
Depot-Padutin und seine therapeutische Verwendbarkeit
Münch. med. Wschr. 95 : 11-15 (1953)
- 14) Fritz, H., H. Schiessler, W.-D. Schleuning:
Proteinases and proteinase inhibitors in the
fertilization process: new concepts of control?
In: Raspe, G., S. Bernhard, (eds.): Adv. Biosciences,
vol. 10, pp. 271-286 .
Pergamon Press-Vieweg, Oxford 1973
- 15) Garbers, D.L., J.D. Lust, N.L. First, H.A. Lardy:
Effects of phosphodiesterase inhibitors and cyclic
nucleotides on sperm respiration and motility
Biochemistry (Wash.) 10. 1825-1831 (1971)
- 16) Gibbons, R.A., R. Sellwood:
The Macromolecular Biochemistry of Cervical Secretions
In: The Biology of the Cervix: Blandau J. and
K. Naphissi
The University of Chicago Press (Chicago and London)

- 17) Gropp, A.:
Segregational versus other chromosomal factor of
impairment of fertility.
Vortrag zum DFG-Symposium " Male reproduction with
special reference to human infertility ".
Schloß Auel, 9.-11. Mai, 1975. Andrologia, in press
- 18) Haendle, H., H. Fritz, I. Trautschold, E. Werle:
Über einen hormonabhängigen Inhibitor für proteo-
lytische Enzyme in männlichen akzessorischen Ge-
schlechtsdrüsen und im Sperma
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 343: 185-188 (1965)
- 19) Haendle, H., H. Ingrisch, E. Werle:
Über einen neuen Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor im
Cervixsekret der Frau
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 351: 545-546 (1970)
- 20) Haesungcharern, A., Chulavatuatol :
Stimulation of Human Spermatozoal Motility By Caffeine
Fert. and Ster. Vol. 24 No. 9. . 661-665 Sept. 1973
- 21) Hartenbach, W.:
Über den heutigen Stand der experimentellen und
klinischen Untersuchungen der Wirkung durch An-
wendungsmöglichkeiten von Padutin
Münch. med. Wschr. 96: 429-431 (1954)
- 22) Heinhold, Gaede:
Ingenieur-Statistik
s. 136ff., 8. Aufl.
Oldenburg; München, Wien 1972
- 23) Igarashi, M., S. Sato, H. Kubo, T. Sato:
Über die Wirkung von Kallikrein auf die Funktion
des Hypophysen-Gonaden-Systems
Endocr. japon. 9: 81-89 (1962)
- 24) Kellerman, A.S., J.C. Weed:
Sperm Motility and Survival in Relation to Glucose
Concentration: An in vitro study
Fert. and Ster. 21. 802-805 (1970)
- 25) Kremer, J.:
A simple sperm penetration test.
Int. J. Fert. Vol. 1, 196-211 (1966)

- 26) Kurzrok, R., E.G. Miller:
Biochemical studies of human semen. III. Factors effecting migration of sperm through the cervix
Am. J. Obst. Gynec. 24, 19 (1932)
- 27) Leidl, W. R. Prinzen, W.-B. Schill, and H. Fritz:
The effect of Kallikrein on motility and metabolism of spermatozoa in vitro
In: Kininogenases-Kallikrein 2 (edited by G.I. Haberland, J.W. Rohen, C. Schirren and P. Huber)
S. 33-40
F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York 1975
- 28) Mandel, P., J. Rodesch, J.M. Mantz:
The treatment of experimental radiation lesions by Kallikrein
L.c. (12), pp. 171-187
- 29) Mandel, P., J. Rodesch, J.M. Mantz:
The treatment of experimental radiation lesions by Kallikrein
L.c. (12), pp. 171-187
- 30) Mann, T.:
Energy requirements of spermatozoa and the cervical environment
In: Blandau R.J. and K.S. Moghissi. Eds. The Biology of the Cervix
University of Chicago. Press: Chicago (1973)
- 31) Masson, P.L.:
Carbohydrate component of cervical mucus
In: Cervical mucus in human reproduction. World Health Organization Colloq. Geneva 1972. Chapt. 7, pp. 82-92
- 32) Meng, K., G.L. Haberland:
Influence of Kallikrein on glucose transport in the isolated rat intestine.
In: Kininogenases-Kallikrein 1 (edited by Haberland)
S. 75-80
Schattauer Verlag, Stuttgart, New York 1973
- 33) Moghissi, K.S., D. Dabich, J. Levie, O.W. Neuhaus:
Mechanism of Sperm Migration
Fert. and Ster. 15, pp. 15-23 (1969)

- 34) Moghissi, K.S.:
Cyclic Changes of Cervical Mucus in Normal and
Progestin-Treated Women
Pert. and Ster. 17, pp. 663-675 (1966)
- 35) Moghissi, K.S.:
Sperm Migration through the Human Cervix
In: The Biology of the Cervix. Eds. Blandau, J.
and K.S. Moghissi.
University of Chicago. Press: Chicago (1973)
- 36) Moghissi, K.S., F.N. Syner:
The effect of seminal protease on sperm migration
through cervical mucus.
Int. J. Fertil. 15, pp 43-49 (1970a)
- 37) Moghissi, K.S., F.N. Syner:
Studies of Human Cervical Mucus: Mucoids and their
Relation to Sperm Penetration
Pert. and Ster. 21, pp. 234-239 (1970b)
- 38) Moghissi, K.S.:
Sperm migration through the human cervix
In: Cervical mucus in human reproduction.
World Health Organization Colloquium Geneva 1972
Chapter 11, pp. 128-152
- 39) Moriwaki, G., H. Moriya, K. Yamaguchi, K.Kizuki, H. Fujimori:
Intestinal absorption of pancreatic kallikrein
and some aspects of its physiological role
In: Kininogenases-Kallikrein 1 (edited by
Haberland, G.L. & J.W. Rohen) pp.57-66
Schattauer Verlag, Stuttgart, New York 1973
- 40) Musacchio, I., A. Ebstein, A.J. Sobrero:
Enzymes in Normal Human Cervical Mucus
In: Cervical mucus in human reproduction.
World Health Organization Colloquium Geneva 1972
Chapter 9, pp. 114-121

- 41) Neuhaus, O.W., K.S. Moghissi:
Composition and Properties of Human Cervical Mucus.
III. A Preliminary Study of the Mucoid Component
Fert. and Ster. 13, pp. 550-558 (1962)
- 42) Odeblad, E.:
Biophysical Techniques of Assessing Cervical Mucus
and Microstructure of Cervical Epithelium
In: Cervical mucus in human reproduction.
World Health Organization Colloquium Geneva 1972
Chapter 5, pp. 58-74
- 43) Odeblad, E.:
Research in Obstetrics and Gynaecology with
Nuclear Magnetic Resonance
Acta obstet. gynec. scand. 38 suppl. 1 , pp. 599-617
(1959)
- 44) Palm, S., H. Fritz:
Components of the Kallikrein-Kinin-System in
Human Midcycle Cervical Mucus and Seminal Plasma
In: Kininogenases- Kallikrein 2 (edited by G.L.
Haberland, J.W. Rohen, C. Schirren and P. Huber)
pp. 17-21
Schattauer Verlag, Stuttgart- New York 1975
- 45) Palm, S., H. Fritz:
Unveröffentlichte Daten
- 46) Ruiz-Velasco, V.:
A Quantitative Spermatic Penetration Test
Int. J. Fert. 7, 11 (1962)
- 47) Rixon, J.W., J.W. Whitfield:
Kallikrein, kinin and cell proliferation
In: Kininogenases- Kallikrein 1 (edited by G.L.
Haberland & J.W. Rohen) pp.131-145
Schattauer Verlag, Stuttgart, New York 1973
- 48) Rohen, J.W., I. Peterhoff:
Stimulation of mitotic activity by Kallikrein
in the gastrointestinal tract of rats
I.c. (12), p. 147-157

- 49) Schill, W.-B., G.L. Haberland:
Kinin-induced enhancement of sperm motility
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 335, pp. 229-231
(1974)
- 50) Schill, W.-B., O. Braun-Falco, G.L. Haberland:
The possible role of kinins in sperm motility
Int. J. Fert. 12, n. 163 (1974)
- 51) Schill, W.-B., G.L. Haberland:
Wirkungen von verschiedenen Komponenten des
Kallikrein-Kinin-Systems auf die Spermatozoen-
Motilität in vitro
Klin. Wschr. 53, S. 73-79 (1975)
- 52) Schill, W.-B., O. Wallner, S. Palm and H. Fritz:
Stimulation of sperm motility and sperm migration
in cervical mucus by kinins
In: E.S.F. Hafez " the human semen and fertility
regulation in the male
Mosby Comp., St. Louis, MO. USA, in press (1976)
- 53) Schill, W.-B., O. Wallner, A. Grösser:
In vitro Stimulation der Spermatozoenmotilität
und Zervixmucuspénétration durch Kallikrein
Vortrag: VII. Akademische Tagung deutschsprechender
Hochschullehrer in der Gynäkologie und Geburtshilfe,
München, 18.-21. Juni 1975
- 54) Schill, W.-B.:
Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von
Kallikrein und Coffein auf die Spermatozoen-
motilität in vitro
In: Jansen, R., F. Lütkje, G. Schirren:
" Fortschritte der Fertilitätsforschung III ",
S. 176-180 Grosse Verlag, Berlin 1976
- 55) Schill, W.-B.:
Increased fructolysis of Kallikrein-stimulated
human spermatozoa
Andrologia 7 (2) : 115-117 (1975)

- 56) Schirren, C., W.-B., N. Hoffmann:
The influence of Kallikrein on semen parameters
of subfertile patients
In: Kininogenases-Kallikrein 2 (edited by G.L.
Haberland, J.W. Rohen, C. Schirren and P. Huber)
pp. 111-127
Schattauer Verlag, Stuttgart, New York 1975
- 57) Schirren, C.:
Praktische Andrologie
Hartmann, Berlin (1971)
- 58) Schoenfeld, D., R.D. Amelar, L. Dubin:
Stimulation of ejaculated human spermatozoa by
caffeine. A preliminary Report
Fertil. and Ster. 24, pp. 772-775 (1973)
- 59) Ulstein, M.:
Fertility of donors at heterologous insemination
Acta Obstet. Gynec. Scand. 52, pp. 97-101 (1973)
- 60) Ulstein, M.:
Interrelation of different parameters at cervical
mucus penetration of spermatozoa
Acta Obstet. Gynec. Scand. 52, 295 (1973)
- 61) Ulstein, M.:
In vitro sperm penetration of cervical mucus and
male fertility
Andrologie 5 (3): pp. 189-191 (1973)
- 62) Ulstein, M.:
Sperm penetration of cervical mucus as a criterion
of male fertility
Acta Obstet. Gynec. Scand. 51, 335 (1972)
- 63) Werle, E., P. Urhahn:
Über den Aktivitätszustand des Kallikreins in der
Bauchspeicheldrüse
Biochemische Zeitung 304, 387 (1940)
- 64) Werle, E., R. Vogel, G. Rüdel:
Zur Frage der Wachstumswirkung von Kallikrein bei
Ratten
Arch. int. Pharmacodyn, 149: S. 119-125 (1964)

65) Winzler, R.J.:

Preliminary observations on carbohydrate components
of cervical glycoproteins
Symposium on The Biology of The Cervix, June 6-12,
1971 Seattle/ USA

66) Witting, H.:

Mathematische Statistik
Teubner Stuttgart 1974, S. 156, S. 184ff.

67) Zanefeld, H.C.D., K.L. Polakoski, G.F.B. Schumacher:

The proteolytic enzyme systems of mammalian genital
tract secretions and spermatozoa
In: Reich, E., R. Buring, E. Shaw, (eds.):
Proteases and biological control. Cold Spring Harbor
Laboratory, Cold Spring Harbor 1975. In press

68) Recommendations regarding nomenclature in the
andrology

Andrologie 2, S. 186 (1970)

69) Alle Wissenschaftler, die am Zustandekommen des Buches
beteiligt waren:

Cervical mucus: Present State of Knowledge.
In: Cervical mucus in human reproduction.
World Health Organization Colloquium Geneva 1972
Chapter 1, pp. 11-21

Abb. 8 und Abb. 9 wurden mir freundlicherweise vom E.R.
122-C.N.R.S., Laboratoire de Physiologie de la Reproduction
I.N.S.E.R.M. - Hôpital de Bicêtre, 94270 Bicêtre France
überlassen.

1 S.23 Dr. W.-R. Schill, Andrologisches Labor, 8 München
Frauenlobstr. 9, Dermatologische Universitätsklinik.

Ich danke an dieser Stelle allen, die am Zustandekommen dieser Arbeit ihren Anteil hatten.

Besonders Herrn Professor Fritz, den Herren Dr. Schill und Dr. Palm möchte ich für die vielerlei gewährte Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Wallner für Anregung und Diskussion.

Für die freundliche Hilfe im Labor bedanke ich mich herzlich bei Frau Gamulin-Vukov und Herrn Rudi Wimmer.

Lebenslauf

Am 5. 1. 1950 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Johann Größer und der Hausfrau Elisabeth Größer, geb. Bock, in München geboren.

Von 1956 bis 1960 besuchte ich die Volksschule an der Werdenfelsstraße in München und trat dann in das naturwissenschaftliche Erasmus-Grasser-Gymnasium ein. Dort machte ich 1970 das Abitur.

Im Herbst 1970 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Nach fünf Semestern legte ich das Physikum ab, nach sieben klinischen Semestern beendete ich am 22. 6. 1976 das Staatsexamen.

